Authentification par l'ADN du pedigree fondateur des premières roses Bourbon

Pascal HEITZLER

Ci-dessus :
'Rose Edouard'
© Monique PATERNOSTER

Dans notre bulletin 2017, nous avions évoqué notre mission « *Roses anciennes à la Réunion* ». Sur invitation par le directeur du jardin botanique Mascarin de la Réunion, Jean-Daniel Lucas et par le conseil régional 974, Marielle Jourdan-David, notre présidente, Gilles Deparis, directeur du jardin botanique de Lyon et moi-même, avions offert nos expertises pour aider à identifier les roses anciennes collectées par le jardin botanique de la Réunion, l'ARMEFLHOR (Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et horticole) et les membres actifs de l'association des jardins créoles. Dans le cadre de ce projet de sauvegarde, nous avions donné des conférences intitulées « *Les roses Bourbon : Passé, Présent, Futur* » et à ce sujet l'occasion a été saisie

pour tisser des liens et réseaux entre nos associations, entre Mascarin et le jardin botanique de Lyon et enfin avec le monde scientifique. Cette expédition coïncidait avec le bicentenaire de la découverte de la rose Bourbon par le botaniste Jean-Nicolas Bréon, dont nous avions suivi le parcours historique et géographique sur l'île. Pour ma part, j'avais proposé de m'intéresser de près à l'origine génétique de la 'Rose Edouard', l'ancêtre de toutes les roses Bourbon et par ce biais, une plante charnière et fondatrice pour de nombreuses roses modernes. En effet, même si Jean-Nicolas Bréon a bien découvert la 'Rose Edouard' à la Réunion, des points essentiels sur l'origine génétique du pedigree fondateur de ces roses restaient flous parce qu'insuffisamment investigués. La question méritait d'être abordée avec une rigueur toute scientifique. J'ai le plaisir de partager avec vous ici nos résultats et réflexions autour de cette enquête généalogique de la première rose Bourbon, et que toute la Réunion attendait avec impatience.

A la recherche de la vraie 'Rose Edouard' : une candidate privilégiée

La découverte par Jean-Nicolas Bréon de la 'Rose Edouard', date de l'année de son arrivée sur l'île de la Réunion en 1817. Le nom « *Edouard*» proviendrait de Monsieur Edouard Périchon, alors propriétaire de la parcelle où Nicolas Bréon reconnut dans cette 'Rose Edouard' un hybride entre une Bengale et une Damas. L'histoire nous dit qu'il était d'usage de cultiver des rosiers pour former des haies parfumées délimitant les propriétés, palissades formées tantôt de rosiers de type Bengale (Chine), tantôt de rosiers bifères ('Damas des Quatre Saisons'). Nous n'avons pas revu de telles haies durant notre séjour, mais à Cilaos, nous avons pu apprécier une haie taillée de façade, uniquement constituée avec *Rosa multiflora carnea*.

Parmi les roses Bourbon anciennes trouvées sur place, nous avions noté quelques clones qui différaient par la couleur des fleurs et la densité des aiguillons sur les tiges. Toutefois, le clone comportant des fleurs parfumées rose soutenu et des tiges modérément armées, correspond le mieux à la description de la 'Rose Edouard'. Une 'Rose Edward' similaire, voire identique, existe en Inde depuis longtemps également. La 'Rose Edouard' et la 'Rose Edward' sont-elles une seule et même rose ?

La 'Rose Edouard', avec ses fleurs en coupe caractéristiques, est semi-double, très parfumée, une particularité héritée des roses de Damas anciennes. L'arbuste a un port droit, érigé qui porte des groupes de fleurs agglomérées à l'extrémité. Les tiges souples montrent des aiguillons de taille hétérogène. La remontance est assez bonne à la Réunion mais en deçà de celle des rosiers de Chine. Les cynorhodons

sont infundibuliformes (en entonnoir allongé), également typiques des Damas. Cette plante est manifestement un hybride entre une Chine et une Damas comme le disent tous les documents historiques.

Avec Malek Alioua, notre responsable de la *plateforme séquençage*, nous avons mis au point une excellente résolution pour la détection d'empreintes génétiques. Cette technique consiste à amplifier des fragments d'ADN (PCR), couplés à un fluorochrome et suivis par spectrométrie de masse. Le polymorphisme des séquences, indiqué par des profils de courbes (voir schéma ci-contre), peut être suivi par la taille du fragment au nucléotide près et représente ainsi une carte d'identité spécifique pour chaque variété. En principe, pour chaque marqueur, deux pics au plus peuvent être détectés chez une variété diploïde (2 septets, soit 14 chromosomes), trois pics pour un triploïde (21 chromosomes) et quatre pour un tétraploïde (28 chromosomes). Nous avons choisi 10 marqueurs différents, au moins un par chromosome, pour une robustesse optimale de comparaison, et pour être sûrs de l'unicité et de la spécificité des profils pour chaque variété.

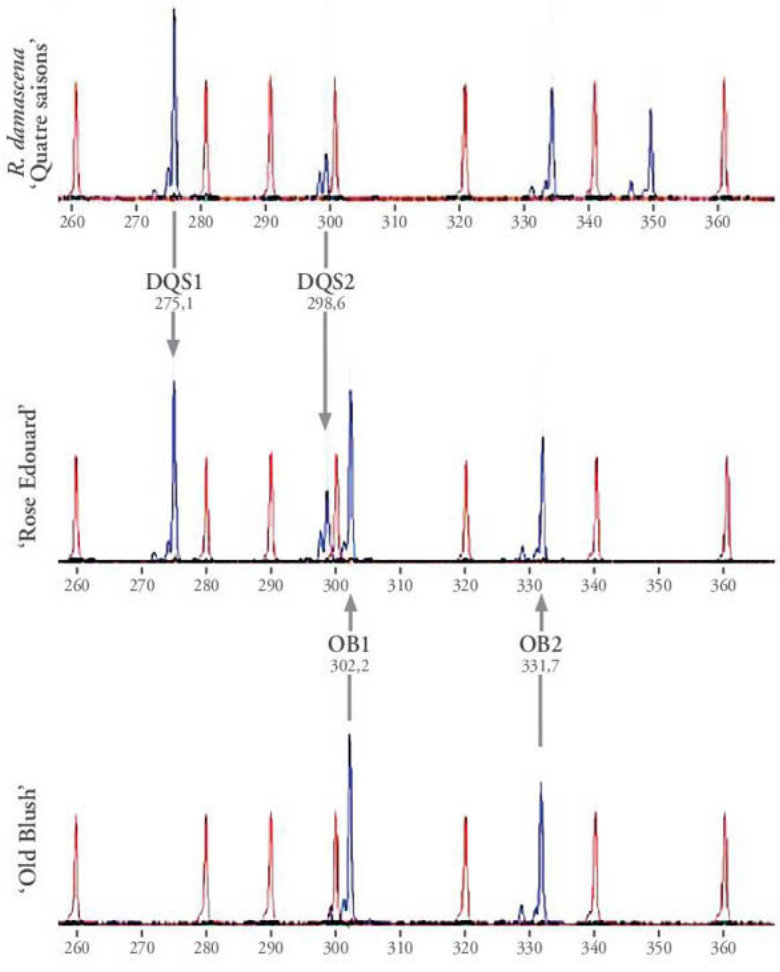
Dans un premier temps, il me semblait important de tester tous les rosiers 'Edouard' ou 'Edward' de différentes collections, et de différents continents, grâce à de généreux collecteurs et amis : Odile Masquelier (*La Bonne Maison*), Daniel Lemonnier (*Les roses de Normandie*), Girija et Viru Viraraghavan (ghâts occidentaux, Inde), les membres réunionnais de l'association des jardins créoles et bien sûr de mon jardin expérimental à Colmar. Les profils sont absolument identiques pour tous les marqueurs de tous les chromosomes.

Ces résultats indiquent que la 'Rose Edouard' type est bien un seul et même clone. La 'Rose Edouard' et la 'Rose Edward' correspondent à la même rose.

Identification du parent 'Damas' de la 'Rose Edouard'

La seconde étape a été de comparer ce profil unique et clair de la 'Rose Edouard' avec celui de ses parents supposés. Il s'agit d'une part de la rose de Damas 'Quatre saisons' et d'autre part d'une rose Bengale, probablement 'Old Blush'. En principe, pour une relation parent-descendant, le profil des courbes doit montrer une identité de la moitié des allèles pour chacun des dix marqueurs considérés.

La rose 'Quatre saisons', avec des hampes florales un peu plus compactes, n'est qu'une forme remontante (sport) de la rose de Damas cultivée pour la production de l'attar en Europe et en Turquie[1]. Il n'est donc pas étonnant que la 'Quatre saisons' partage les mêmes empreintes génétiques que les Damas non-remontantes comme celle de 'Kazanlik' et la 'York and Lancaster'[2,3,4]. Nous avons donc comparé la 'Rose Edouard' avec la Rose 'Quatre saisons' et avons constaté que pour chaque



Profils d'ADN

Exemple de comparaison d'un profil d'ADN de 'Rose Edouard' avec les profils de *R. damascena* 'Quatre saisons' et de 'Old Blush'. L'ADN de 'Rose Edouard' comprend deux allèles de *R. damascena* 'Quatre saisons' (DQS) et deux allèles de 'Old Blush' (OB).

locus, au minimum 50% d'identité des allèles. La rose de Damas et la 'Rose Edouard' sont toutes deux tétraploïdes (2N = 28). Les résultats sont compatibles avec l'idée que 2 allèles sur quatre, sont transmis, de la première à la seconde. La rose de Damas 'Quatre saisons' est bien un parent direct de la 'Rose Edouard'. La remontance de cette dernière est en partie héritée par ce parent.

Identification du parent 'Bengale' de la 'Rose Edouard'

L'autre parent de la 'Rose Edouard' est supposé correspondre à une rose Bengale. Sans a priori, j'ai choisi de tester les roses Bengale anciennes qui existent sur l'île de la Réunion depuis au moins 200 ans : 'Bengale Crimson', 'Slater's Crimson' et 'Old Blush'. Leur profil ADN a été comparé à celui de la 'Rose Edouard'. Clairement, les deux premières présentent des profils qui ne sont pas compatibles avec celui de la 'Rose Edouard' : ces candidats sont donc exclus. Par contre, 'Old Blush' semble correspondre au deuxième parent. Les allèles de la 'Rose Edouard' qui ne proviennent pas du premier parent Damas 'Quatre Saisons', correspondent tous à ceux d''Old Blush'. Si cette dernière semble être un bon candidat, elle est néanmoins diploïde ! Le croisement entre une rose diploïde et une rose tétraploïde devrait faire de la 'Rose Edouard', une rose triploïde ! Or nous savons que cette dernière est tétraploïde. Il y a donc comme une incohérence. En fait, dans des croisements de roses avec des ploïdies différentes, des non-disjonctions occasionnelles sont toujours possibles[5]. Dans ce cas, pour chaque locus, 'Old Blush' ne devrait pas simplement avoir donné la moitié de ses chromosomes à la 'Rose Edouard', mais la totalité. Cette hypothèse est en accord avec la nature des profils observés chez la 'Rose Edouard'. 'Old Blush' est bien l'autre parent avéré de la 'Rose Edouard'.

Authentification des parents de la 'Rose Edouard'

Les parents de la 'Rose Edouard' sont des roses très anciennes et très connues : Damas 'Quatre saisons' et 'Old Blush'. Le clone originel de la Damas 'Quatre saisons' provient d'un semis qui a dû germer il y a bien plus de deux mille ans[1]. La rose de Damas n'est pas une espèce mais bien un hybride complexe[2]. L'Iran est très vraisemblablement le berceau de la rose de Damas, puisque le pays abrite la plus grande biodiversité de clones, distincts du point de vue de leur profil ADN alors qu'ils sont souvent très semblables d'aspect[6].

De la même manière, 'Old Blush' est très ancien et existe depuis près de 1 000 ans en Chine (dynastie Song). Il s'agit d'une forme remontante très ancienne et dont la valeur horticole est toujours encore appréciée aujourd'hui sur tous les continents. Le séquençage complet de son génome a permis de comprendre qu'à

l'origine, 'Old Blush' est un hybride entre *R. chinensis* et *R. odorata*[7]. En Chine, il existe une diversité de clones distincts par l'ADN mais très semblables[8].

Pour ces raisons, nous avons voulu consolider l'idée que les plantes utilisées pour cette étude, 'Old Blush' et Damas 'Quatre Saisons', sont bien les bons clones. Certes, leur paternité avec la 'Rose Edouard', confirmé par l'ADN, est déjà un argument fort dans ce sens. Nous avons néanmoins cherché à confirmer le lien de parenté de ces deux plantes avec d'autres descendants supposés. La première est 'Champneys' Pink Cluster', issue du croisement fondateur des roses Noisette : 'Old Blush' x *R. moschata*. Nous avons confirmé avec nos méthodes plus actuelles et plus précises, les travaux précédents du Dr Morvillo[9] : 'Champneys Pink Cluster' est bien une descendante directe de notre rose 'Old Blush', elle-même le parent de la 'Rose Edouard'.

Qu'en est-il pour la Damas 'Quatre Saisons' ? La rose 'Stanwell Perpetual', une des roses anciennes préférées d'Odile Masquelier, est un hybride spontané, apparu dans un jardin anglais dans les années 1820. Elle est supposée provenir d'un croisement entre une *R. spinosissima* inconnue et la Damas 'Quatre Saisons'. Nous avons confirmé pour la première fois que la rose de Damas 'Quatre Saisons' est bien le parent direct de 'Stanwell Perpetual'. Cette dernière est bien une autre demi-sœur de la 'Rose Edouard'.

Ces résultats parallèles, quelque peu éloignés de notre propos autour de la rose Bourbon, nous confortent dans l'idée que les roses 'Old Blush' et Damas 'Quatre Saisons' que nous avons échantillonnées dans notre collection, représentent bien les variétés historiques et authentiques. En effet, elles sont les parents de différentes roses, elles-mêmes anciennes, mais contemporaines, apparues sur différents continents. Ces arguments renforcent considérablement la robustesse du pedigree proposé dans notre étude.

Identification de descendants directs de la 'Rose Edouard'

Par sa provenance exotique, la 'Rose Edouard' est une des premières roses qui naquît dans l'hémisphère Sud. La découverte de la première rose Bourbon n'a pas que généré une nouveauté horticole locale et anecdotique, mais confirme qu'elle est bien l'ancêtre de tout un nouveau groupe de roses, les roses Bourbon, elles-mêmes à l'origine des hybrides remontants et par extension, à quantité de roses modernes cultivées dans le monde entier. L'histoire européenne de la biodiversité naissante des rosiers Bourbon reste encore confuse aujourd'hui mais il est clair que cette nouvelle classe de roses allait considérablement bouleverser l'évolution horticole des roses ultérieures. Nous savons que Jean-Nicolas Bréon fit

parvenir des akènes de la 'Rose Edouard' à Antoine Jacques, un grand spécialiste de roses, botaniste et jardinier en chef du Duc d'Orléans (futur roi Louis XVIII). Le premier semis adulte fut immortalisé en 1824 par Pierre-Joseph Redouté sous le nom de *Rosa* (*canina*?) *borboniana*. Je ne suis pas sûr que cette plante existe toujours aujourd'hui. Par contre, il existe d'autres candidats en tant que descendants directs supposés de la 'Rose Edouard'.

La première est un semis de Bréon de 1817, très vraisemblablement issu de cynorhodons de la Réunion. Le rosier correspondant existe toujours dans les grandes roseraies d'envergure internationale comme à l'Haÿ les Roses et à Sangerhausen sous le nom de *R. x borboniana* ou 'Bourbon Jacques'. Le rosier drageonnant est très vigoureux et envoie ses cannes à plus de deux mètres. Les fleurs sont d'un rose nettement plus pâle que celle de la 'Rose Edouard'. La deuxième est la 'Rose des Ile-Bourbon' ou 'Bourbon Queen', diffusée par Mauget en 1834. Comme elle est plus tardive, on suppose que cette plante dérive d'un semis d'une 'Rose Edouard', établie alors en France depuis 1822. Alternativement, cette rose non-remontante proviendrait d'un autre semis de Bréon. La 'Rose des Ile-Bourbon' est elle-même le parent d'autres roses Bourbon développées en France et en Europe.

Les empreintes génétiques des deux roses candidates décrites peu avant, et qui sont tétraploïdes, ont été confrontées avec celles de la 'Rose Edouard'. Les tests ADN montrent dans les deux cas une identité de 50% des marqueurs pour chaque locus considéré, soit au moins deux allèles sur quatre. Parmi ces marqueurs communs, il y a souvent un allèle d''Old Blush' et un allèle de la 'Damas Quatre Saisons', c'est-à-dire des grands-parents. Les autres marqueurs viennent d'un autre parent inconnu. Nos résultats constituent les preuves que *R. x borboniana* et la 'Rose de l'Isle-Bourbon' représentent bien des descendants directs de la 'Rose Edouard', c'est-à-dire de la première génération horticole des roses Bourbon.

Conclusions
Généalogie authentifiée des roses Bourbon pionnières

Nicolas Bréon avait noté dès 1817 que la 'Rose Edouard' combine les qualités d'une rose Bengale, probablement 'Old Blush' avec la Damas 'Quatre Saisons'. Il a diffusé des graines et des boutures de cette rose hybride en France et ainsi il a été à l'origine de l'essor de la lignée incontournable des roses Bourbon. Nos résultats ADN corroborent cette chronologie et aussi le travail de Bréon. Dans leurs travaux récents sur la variété 'Hermosa', Julie Matlin et Sherri Berglund[10] avaient déjà vivement suggéré qu''Old Blush' pourraient être un parent de la 'Rose Edouard'. Nous avons amené la technique des comparaisons ADN à une

résolution optimale, pour plus de précisions au niveau de l'hérédité pour chaque chromosome et ainsi fait disparaître bon nombre d'artefacts. Nos résultats offrent cinq arguments majeurs qui ensemble font bloc en faveur de l'authenticité de la 'Rose Edouard' de Bréon. Premièrement, des 'Roses Edouard' de la Réunion, de l'Inde et de France correspondent à une seule et unique rose. Deuxièmement, 'Old Blush' est un parent avéré de la 'Rose Edouard'. Troisièmement, la Damas 'Quatre Saisons' est un parent avéré de la 'Rose Edouard'. Quatrièmement, les roses anciennes, populaires et contemporaines à la découverte de la première rose Bourbon, 'Champney's Pink Cluster' et 'Stanwell Perpetual', sont des demi-sœurs avérées de la 'Rose Edouard' : le profil génétique de leurs parents communs, 'Old Blush' et la Damas 'Quatre Saisons', correspond à ceux des clones cultivés de nos jours et les authentifie simultanément dans notre collection. Cinquièmement, deux roses Bourbon historiques de première génération sont bien les descendants directs de cette même 'Rose Edouard'. La boucle est bouclée. Nous résumons le pedigree fondateur des roses Bourbon dans le schéma ci-contre. Nos résultats sont en parfait accord avec les données botaniques de Bréon.

Bien des confusions entouraient la chronologie et les aspects historiques de la genèse des premières roses Bourbon. Nous ne saurons probablement pas tous les détails de cette chronologie. Par exemple, la 'Rose Edouard' était-elle déjà bien établie et multipliée à la Réunion en 1817 ? Existait-elle déjà bien avant en Inde ? Ou est-elle apparue peu avant l'arrivée de Bréon à la Réunion, dans la propriété d'Edouard Périchon ? Et ensuite, elle a été multipliée en Inde sous le nom de la 'Rose Edward' ?

Il faut rester lucide, nos analyses ADN ne pourront trancher définitivement ces questions. Mais il est plausible que si la 'Rose Edouard' était d'abord apparue en Inde longtemps avant 1817, Bréon n'aurait pas pu donner autant de détails sur l'ascendance supposée de cette rose. L'hypothèse de la naissance de la première rose Bourbon à la Réunion semble donc privilégiée. Nous avons des documents sur l'histoire des colonies françaises, qui attestent que les Périchon, qui connaissaient la 'Rose Edouard' avant Bréon, formaient une famille influente de la Réunion, qui faisait affaire sur l'île Maurice et en Inde.

Nos analyses montrent également que le caractère tétraploïde de la 'Rose Edouard' est intimement lié à un évènement de non-disjonction du génome d''Old Blush'. Cet accident génétique paraît anodin, mais il a été plus que providentiel puisque si la 'Rose Edouard' avait été triploïde, elle n'aurait certainement jamais eu ni la fertilité ni la descendance si cruciale et phénoménale que l'on connaît. L'authentification des parents que nous donnons ici pour la 'Rose Edouard' explique aussi la transmission récessive de son caractère de remontance. Par

ailleurs, le génome d'‘Old Blush’ vient d'être séquencé[7,11], ‘Old Blush’ étant un des piliers dans le lignage des roses actuelles et une source pionnière pour le caractère remontant de la rose. Notre étude renforce considérablement ces propos et montre que la rose ‘Old Blush’ en tant que parent direct de la ‘Rose Edouard’ est plus que jamais incontournable dans la transmission de ces qualités chez les roses modernes.

Enfin la ‘Rose Edouard’ a largement été diffusée en Inde et au Pakistan où elle remplace avantageusement la rose de Damas pour la parfumerie et la cosmétique, parce que mieux adaptée aux climats doux sans hiver froid. A la Réunion, nous avons appris qu'elle faisait partie de la pharmacopée locale dans les îlets de montagne où historiquement les personnes vivaient en totale autarcie. Elle est toujours encore utilisée pour lutter contre les septicémies des yeux notamment.

Perspectives

Les attentes et les enjeux culturels et économiques de cette histoire sont forts. Au moment du bicentenaire de la découverte de la ‘Rose Edouard’ par Jean-Nicolas Bréon, et à l'occasion des journées du patrimoine 2017, nous avions assisté à la plantation toute symbolique de cette rose dans le jardin botanique Mascarin, en présence des représentants du Conseil Départemental 974 et des acteurs botanistes et horticoles de la Réunion. Un projet de sauvegarde et de valorisation du patrimoine horticole et historique de la Réunion s'était alors mis en place, en partenariat avec l'association *Jardins Créoles*, l'ARMEFLHOR et l'Union des Horticulteurs et Pépiniéristes de la Réunion (UHPR). Un des objectifs du projet roses Bourbon consiste à accompagner l'émergence d'une filière professionnelle horticole, spécialisée dans la rose et basée sur un savoir-faire de qualité avec des pratiques écologiques et durables. Des pépiniéristes enthousiastes sont mobilisés malgré le contexte économique insulaire difficile.

Notre étude va naturellement contribuer à valoriser le caractère patrimonial de la ‘Rose Edouard’ à la Réunion. Le pedigree fondateur que nous proposons ici, servira de bases solides pour explorer les autres roses Bourbon trouvées sur l'île de la Réunion afin d'établir une sorte de filiation entre elles. Il constituera également un pilier robuste pour toutes futures investigations sur les relations phylogénétiques en progressant vers les roses plus récentes.

Je tiens à remercier le Conseil Régional de la Réunion, Daniel-Jean Lucas, le directeur du jardin botanique de la Réunion, pour leur soutien et leur confiance; Monique Paternoster, chargée de mission scientifique au Mascarin, Jacques Fillatre, ingénieur responsable de projet à l'ARMEFLHOR, Jacques Maria, président de

R. damascena
'Quatre saisons'
4N

'Old Blush'
2N

'Stanwell Perpetual'
4N, avant 1823

'Rose Edouard'
4N, avant 1817

'Champneys Pink Cluster'
2N, 1802

R. x borboniana
4N, 1820

'Reine des Ile-Bourbon'
4N, 1834

Pedigrees authentifiés
Descendance avérée par des tests d'ADN lors de cette étude.

l'association des jardins créoles pour les discussions et soutiens permanents, et tous les acteurs de cette initiative réunionnaise *Roses Bourbon* ainsi que l'ensemble des personnels et bénévoles pour leur hospitalité créole si chaleureuse.

Un grand merci aussi à Jirija et Viru Viraraghavan, Behcet Ciragan, Daniel Lemonnier, Odile Masquelier, et Marielle Jourdan-David pour les discussions et/ou échantillons.

Bibliographie

1. Heitzler P. 2016. New insights on the origin of Damask roses. Roses anciennes en France, 23: 70-77.
2. Iwata H., Kato, T. and Ohno, S. 2000. Triparental origin of Damask roses. Gene 259: 53-59.
3. Scariot V., Akkak A. and Botta R. 2006. Characterization and genetic relationships of wild species and old garden roses based on microsatellite analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131: 66-73.
4. Rusanov K., Kovacheva A., Atanassov A. and Atanassov I. 2009. *Rosa damascena*, the oil-bearing damask rose: genetic resources, diversity and perspectives for molecular breeding. Floriculture and Ornamental Biotechnology 3, 14-20.
5. Ueckert J., Byrne D.H., Crosby K., Hodnett G. and Stelly D. 2015. The utilization of the polyploid nature of roses. Acta Hortic. 1064: 73-78.
6. Kiani M., Zamani Z., Khalighi A., Fatahi R. and Byrne D H. 2008. Wide genetic diversity of *Rosa damascena* germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. Scientia Horticulturae 115: 386-392.
7. Raymond O., *et al.* 2018. The *Rosa* genome provides new insights into the domestication of modern roses. Nature Genet. 50: 772-777.
8. Tan J., Wang J., Luo L., Yu C., Xu T., Wu Y., Cheng T., Wang J., Pan H. and Zhang Q. 2017. Genetic relationships and evolution of old Chinese garden roses based on SSRs and chromosome diversity. Scientific reports 7: 15437. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15815-6.
9. Wagner A., Frederick C. and Morvillo N. 2002. Investigation of the origin of 'Champneys' Pink Cluster', 'Blush Noisette' and 'Napoleon' roses using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Proc. Fla. State Hort. Soc. 115: 120-122.
10. Matlin J. and Berglund S. Investigation of 'Hermosa' and related cultivars using DNA microsatellite analysis. The Indian Rose Annual XXXII 2016: 17-25.
11. Hibrand Saint-Oyant, L., *et al.* 2018. A high-quality genome sequence of *Rosa chinensis* to elucidate ornamental traits. Nature Plants 4: 473-484.

DNA authentication of the Bourbon rose founding pedigree

Pascal HEITZLER
Translated by the author

In our 2017 bulletin, we described our mission *"Old Roses at the Reunion"*. Upon invitation by the Director of the Mascarin botanical garden of Reunion, Daniel-Jean Lucas and by the Regional Council 974, Marielle Jourdan-David, our President, Gilles Deparis, Director of the botanical garden of Lyon and myself, had provided some expertise to help identify the old roses collected by the Botanical Garden of Reunion, ARMEFLHOR (Reunion Association for the Modernization of the Fruit Economy, Vegetable and Horticulture) and active members of the Association of Creole Gardens. As part of this safeguard project, we gave lectures entitled *"Bourbon Roses: Past, Present, Future"* and on this topic the opportunity was taken to build links and networks between our associations, between Mascarin and the Botanical Garden of Lyon and finally with the local scientists. This expedition coincided with the bicentenary of the discovery of the first Bourbon Rose by the botanist Jean-Nicolas Bréon, whose historical and geographical course we had followed on the island. For my part, I had proposed to focus my interest on the genetic origin of the Edouard rose, the ancestor of all Bourbon roses and by this way, a founding plant for many modern roses. Indeed, even though Jean-Nicolas Bréon discovered the 'Rose Edouard' in Reunion, essential points about the genetic origin of the founding pedigree of these roses remained unclear because insufficiently investigated. The issue deserved to be approached with scientific rigour. I am pleased to share with you here our results and thoughts on this genealogical survey of the first Bourbon rose, long-awaited by all our friends from the Reunion.

Towards the search of the true 'Rose Edouard': a privileged candidate

The discovery by Jean-Nicolas Bréon of the 'Rose Edouard', the first Bourbon rose, happened in the year of his arrival on the Reunion Island in 1817. The name *"Edouard"* would come from Monsieur Edouard Périchon, then owner of the land plot where Nicolas Bréon recognized in this 'Rose Edouard' a hybrid

between a Bengal and a Damask rose. In the past, it was the tradition to cultivate roses to form perfumed hedges delineating the properties, mostly either with Bengale (China), or with the 'Four Seasons Damask'. We did not see such hedges during our trip, but in the front of a lovely cottage at Cilaos, we were able to appreciate an old hedge, only constituted with *Rosa multiflora carnea*.

Among the early bourbon roses found on the site, we had noticed some differences in the color of the flowers and the density of the thorns on the stems. However, the clone with strong pink fragrant flowers and with moderate prickly stems best matches the description of the 'Rose Edouard'. A similar or even identical 'Edward' rose has been described in India for many decades. Are the 'Rose Edouard' and the 'Edward' rose one and the same rose?

The 'Rose Edouard', with its characteristic cup-shaped flowers, is semi-double, very fragrant, a trait inherited from the ancient Damask roses. The shrub has a right, set up port which carry few agglomerated terminal flowers. The supple stalks show prickles with heterogeneous size. The remontancy is rather good in Reunion but below that of the China rosebushes. The hips are infundibuliform (long funnel), also typical from the Damasks. This plant is obviously a hybrid between a China and a Damask rose according all the historic documents.

Together with Malek Alioua, our manager of the sequencing platform, we have developed an excellent resolution for the detection of DNA fingerprints. This technique consists in amplifying DNA fragments (PCR), coupled with a fluorochrome and followed by mass spectrometry. The polymorphism of the sequences, indicated by curves profiles (see scheme *"Profils d'ADN"*), can be followed by the sharp size of the fragment and thus represents a specific identity card for each variety. In principle, for each marker, a maximum of two peaks can be detected in a diploid variety (2 septets, or 14 chromosomes), three peaks for a triploid (21 chromosomes) and four peaks for a tetraploid (28 chromosomes). We chose ten different markers, at least one per chromosome, for optimal robustness of comparison, and to be sure of the uniqueness and specificity of the profiles for each variety.

At first, it seemed important to test all the Edouard and Edward roses from different collections, and from different continents, thanks to generous collectors and friends: Odile Masquelier (*La Bonne Maison*), Daniel Lemonnier (*Les roses de Normandie*), Girija and Viru Viraraghavan (Western Ghats, India), Reunion members of the association of Creole gardens and of course my own experimental garden in Colmar. The profiles are absolutely identical for all markers of all chromosomes.

These results indicate that the typical 'Rose Edouard' is one and the same clone. The 'Rose Edouard' and the 'Edward' rose correspond to the same rose.

Identification of the Damask parent of 'Rose Edouard'

The second step was to compare this unique and sharp profile of the Edouard rose with that of her alleged parents. It is on the one hand the Damask rose 'Four Seasons' and on the other hand a Bengal rose, probably 'Old Blush'. In principle, for a parent-descendant relationship, the profile of the curves must show an identity of half of the alleles for each of the ten considered markers.

The 'Four Seasons' rose, with slightly more compact flower stems, is nothing more than a sport from the non-reblooming Damask rose, as the one grown for attar production in Europe and Turkey[1]. It is therefore not surprising that the 'Four Seasons' share the same DNA fingerprints as the 'Kazanlik' or 'York and Lancaster' Damask roses[2,3,4]. So we compared the 'Rose Edouard' with the Rose 'Four Seasons' and found for each locus, at least 50% allele identity. The Damask rose and the Edouard rose are both tetraploid (2N = 28). The results are consistent with the idea that two out of four alleles are transmitted, from the first to the second. The Damask rose 'Four Seasons' is a direct parent of 'Rose Edouard'. The reblooming trait of the latter is in part inherited by this parent.

Identification of the Bengal parent of 'Rose Edouard'

The other parent of the 'Edouard' rose is assumed to be a Bengal rose. Without preconceived ideas, I chose to test the ancient Bengal roses that have been cultivated on the Reunion Island for at least 200 years: Bengal Crimson, Slater's Crimson and Old Blush. Their DNA profile was compared to that of the 'Rose Edouard'. Clearly, the first two have profiles that are not compatible with that of the 'Rose Edouard': these candidates were therefore excluded. On the other hand, 'Old Blush' seems to correspond to the second parent. The alleles of the 'Rose Edouard' that do not come from the first parent 'Quatre Saisons', all correspond to those of 'Old Blush'. If the latter seems to be a good candidate, it is nevertheless diploid! The crossing between a diploid rose and a tetraploid rose should make the 'Rose Edouard', a triploid rose! We know that the latter is tetraploid. So, there is an inconsistency. In fact, in crosses of roses with different ploidies, occasional non-disjunctions are always possibles[5]. In this case, for each locus, 'Old Blush' should not simply have given half of its chromosomes to 'Rose Edouard', but all. This assumption is consistent with the nature of the patterns observed in the 'Rose Edouard'. 'Old Blush' is the other proven parent of the 'Rose Edouard'.

Authentication of 'Rose Edouard' parents

The parents of the 'Rose Edouard' are well-known and antique roses: the perpetual Damask 'Four Seasons' and 'Old Blush'. The original clone of the 'Four Seasons' comes from a seedling that must have sprouted well over two thousand years[1]. The Damask rose is not a species but a complex hybrid. Iran is most likely the country of her ethnobotanic origin, since the largest biodiversity of the Damask clones, is found there[6].

Similarly, 'Old Blush' is very old and has been around for nearly 1,000 years in China (Song Dynasty). It is a very ancient reblooming form whose horticultural value is still appreciated today on all continents. The complete sequencing of its genome has revealed that 'Old Blush' was originally a hybrid between *R. chinensis* and *R. odorata*[7]. In China, there are multiple similar clones, however with distinct DNA profiles[8].

For these reasons, we wanted to reinforce the idea that the plants used for this study, 'Old Blush' and the Damask 'Four Seasons', are the right clones. Certainly, their fatherhood with the 'Rose Edouard', confirmed by DNA, already stated this point of view. We nevertheless sought to confirm the relationship of these two plants with other presumed descendants. The first is Champneys' Pink Cluster, a product of the founding cross of the 'Noisette' roses: 'Old Blush' x *R. moschata*. We have confirmed with our updated methods, the previous work of Dr Morvillo[9]: 'Champneys' Pink Cluster' is a direct descendant of our 'Old Blush' rose, herself the parent of the 'Rose Edouard'.

What about the perpetual Damask? 'Stanwell Perpetual', one of Odile Masquelier's favourite old roses, is a spontaneous hybrid that appeared in an English garden in the 1820s. It is supposed to derive from a cross between an unknown *R. spinosissima* and the Damask 'Four Seasons'. We confirmed for the first time that the Damask rose 'Four Seasons' is indeed the direct parent of 'Stanwell Perpetual'. The latter is another half-sister of the 'Rose Edouard'.

These parallel results, somewhat separate from our topic about the Bourbon rose, strongly supported the idea that the 'Old Blush' and 'Four Seasons' roses that we sampled in our collection, represent the historical and authentic varieties. In fact, they are parents of different contemporary founding roses, appearing on different continents. These arguments considerably reinforce the robustness of the pedigree proposed in our study.

Identification of direct descendants of 'Rose Edouard'

Due to its exotic origin, the 'Rose Edouard' is one of the first roses to be born in the southern hemisphere. The discovery of the first Bourbon rose has not only generated a local and anecdotal horticultural novelty, but the ancestor of a whole

new group of roses, the Bourbon roses, themselves at the origin of the reblooming hybrids and by extension, many modern roses grown worldwide. The European history of the emerging biodiversity of Bourbon roses remains blurred today but it is clear that this new class of roses would dramatically change the horticultural evolution of the later roses. We know that Jean-Nicolas Bréon sent achenes from the 'Rose Edouard' to Antoine Jacques, a great rose specialist, botanist and chief gardener of the Duke of Orleans (future King Louis XVIII). The first adult seedling was immortalized in 1824 by Pierre-Joseph Redouté under the name of *Rosa* (*canina*?) *borboniana*. I'm not sure that this plant still exists today. However, there are other candidates as direct descendants of the 'Rose Edouard'.

The first is a Bréon seedling from 1817, most likely from hips originated from the Reunion. The corresponding rose still grows in the internationally renowned rose gardens such as L'Haÿ and Sangerhausen, as *R. x borboniana* or 'Bourbon Jacques'. The rosebush, freely suckering, is very vigorous and sends its canes more than two meters high. The flowers are markedly paler pink than the 'Rose Edouard'. The second is the 'Rose des Ile-Bourbon' or 'Bourbon Queen', released by Mauget in 1834. Since it is later, this plant is assumed to derive from a seedling of 'Rose Edouard', then established in France since 1822. Alternatively, this rose would come from another seedling from Bréon. The 'Rose des Ile-Bourbon' is itself the parent of several other Bourbon roses developed in France and Europe.

The genetic fingerprints of the two candidate roses described shortly before, which are tetraploids, were compared with those of the 'Rose Edouard'. The DNA tests show in both cases an identity of 50% of the markers for each locus considered, that means at least two out of four alleles. Among these shared markers, there is often an 'Old Blush' allele and a 'Four Seasons' allele, from the grandparents. The other markers are from another unknown parent. Our results provide evidence that the 'Rose Jacques' and 'Rose des Ile-Bourbon' represent direct descendants of 'Rose Edouard', the first generation of the Bourbon roses.

Conclusion

Authenticate genealogy of the pioneer Bourbon

Nicolas Bréon noticed in 1817 that the Edouard rose combines the qualities of a Bengal rose, probably 'Old Blush' with the Damask 'Four Seasons'. He spread seeds and cuttings of this hybrid rose in France and so he was at the origin of the development of the major line of Bourbon roses. Our DNA results corroborate this timeline and also Bréon's work. In their recent work on 'Hermosa', Julie Matlin and Sherri Berglund[10] had already strongly suggested that 'Old Blush' could be a parent of 'Rose Edouard'. We brought the technique of DNA comparisons to

an optimal resolution, for more precision in the heredity for each chromosome and thus removed unwelcome artefacts. Our results offer five major arguments that together strongly support the authenticity of Bréon's 'Rose Edouard'. First, the clones of 'Rose Edouard' from Reunion, India and France, correspond to a single rose. Second, 'Old Blush' is a proven parent of 'Rose Edouard'. Third, the Damask 'Four Seasons' is the other proven parent of 'Rose Edouard'. Fourth, the ancient popular roses, contemporary to the discovery of the first Bourbon, 'Champneys Pink Cluster' and 'Stanwell Perpetual', are proven half-sisters of the 'Rose Edouard': the genetic profiles of their common parents, 'Old Blush' and 'Four Seasons' match those of today's cultivated clones and simultaneously authenticate them in our collection. Fifth, two historic first-generation Bourbon roses are the direct descendants of this same 'Rose Edouard'. The loop is over. We summarize the founding pedigree of the Bourbon roses in the scheme *"Pedigrees authentifiés"*. Our results are in perfect agreement with Bréon's botanical data.

Many confusions surrounded the chronology and historical aspects of the genesis of the first Bourbon roses. We probably won't know all the details of that timeline. For example, was the 'Rose Edouard' already well established and multiplied at Reunion in 1817? Did it already exist long before in India? Or did it appear shortly before Bréon's arrival in Reunion, on the property of Edouard Périchon? And then it was multiplied in India under the name of 'Edward Rose'?

We must remain lucid, our DNA tests will not be able to definitively decide these questions. But it is plausible that if 'Rose Edouard' had first appeared in India long before 1817, Bréon would not have been able to give as much detail about the supposed ancestry of this rose. The hypothesis of the birth of the first Bourbon rose in Reunion thus seems privileged. We have documents on the history of the French colonies, which attest that the Périchon, who knew the 'Rose Edouard' before Bréon, were an influential family of Reunion, which did business in Mauritius and India.

Our analyses also show that the tetraploid character of the 'Rose Edouard' is intimately linked to an event of non-disjunction of the 'Old Blush' genome. This genetic accident seems innocuous, but it was more than providential since if the 'Rose Edouard' had been triploid, it would certainly never have had the fertility or the so crucial and phenomenal offspring that we know. The authentication of the parents we give here for the 'Rose Edouard' also explains the recessive transmission of its remontancy. In addition, the genome of 'Old Blush' has just been sequenced[7,11], 'Old Blush' being one of the pillars in the lineage of current roses and a pioneer source for the continuous flowering character. Our study considerably reinforces these remarks and shows that 'Old Blush' as the direct

parent of 'Rose Edouard', is more than ever indispensable in the transmission of these qualities in modern roses.

Finally, 'Rose Edouard' has been widely distributed in India and Pakistan where it replaces the Damask rose for perfumery and cosmetics, because it is better suited to mild climates without cold winter. At the Reunion, we learned that it was part of the local pharmacopoeia in the mountain islets where historically people lived in total self-sufficiency. It is still used to combat eye septicaemia in particular.

Perspectives

The cultural and economic stakes of this history are deep. At the time of the bicentennial of the discovery of 'Rose Edouard' by Jean-Nicolas Bréon, and on the occasion of the 2017 Heritage Days, we attended the symbolic planting of this rose in the Mascarin botanical garden, in the presence of the representatives of the 974 Departmental Council and the botanical and horticultural actors of the Reunion. A project to safeguard and enhance the horticultural and historical heritage of the Reunion was then established, in partnership with the association 'Jardins Créoles', ARMEFLHOR and the *Union des Horticulteurs et Pépiniéristes de la Réunion* (UHPR). One of the objectives of the Bourbon rose project is to support the emergence of a professional horticultural sector, specialized in rose and based on quality know-how with ecological and sustainable practices. Enthusiastic nurseries are being mobilized despite the difficult island economic context.

Our study will naturally contribute to enhance the heritage character of 'Rose Edouard' at Reunion. The founding pedigree that we propose here, will serve as a solid basis to explore the other bourbon roses found on the island in order to establish a kind of filiation between them. It will also be a robust pillar for any future investigations into phylogenetic relationships by progressing towards more recent roses.

I would like to thank the Regional Council of the Reunion, Daniel-Jean Lucas, the director of the botanical garden of the Reunion, for their support and confidence; Monique Paternoster, mission investigator for scientific affairs at the Mascarin, Jacques Fillatre, project engineer at ARMEFLHOR, Jacques Maria, president of the Association of Creole Gardens for discussions and ongoing support, and all the actors of this Reunion *"Roses Bourbon"* initiative, as well as all staff and volunteers for their warm Creole hospitality.

A big thank you also to Jirija and Viru Viraraghavan, Behcet Ciragan, Daniel Lemonnier, Odile Masquelier, and Marielle Jourdan-David for the discussions and/or samples.